

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720061152194

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

探针熔解曲线分析应用于丙型肝炎病毒的  
基因分型

Genotyping of Hepatitis C Virus with Probes Melting  
Curve Analysis

谢 晓 婷

指导教师姓名: 李 庆 阁 教授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 6 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	2
第一章 HCV 分型诊断概述 .....	4
§1.1 HCV 概述 .....	4
§1.2 HCV 基因型分类 .....	5
§1.3 HCV 基因型的进化与分布 .....	8
§1.4 HCV 基因型的临床相关性 .....	8
§1.5 丙型肝炎的实验室诊断 .....	9
§1.6 基于核酸检测的 HCV 基因分型方法 .....	10
§ 1.6.1 检测区的选择 .....	10
§ 1.6.2 测序分析法 .....	11
§ 1.6.3 反向线性杂交法 .....	11
§ 1.6.4 Invader HCV .....	11
§ 1.6.5 型特异引物扩增 .....	12
§ 1.6.6 RFLP .....	12
§ 1.6.7 实时荧光 PCR .....	13
§1.7 论文的设想 .....	13
第二章 材料和方法 .....	14
§2.1 6 种 HCV 基因亚型阳性质控品的构建 .....	14
§ 2.1.1 HCV 阳性质控品（假病毒）的构建 .....	14
§ 2.1.2 HCV 假病毒的验证 .....	15
§ 2.1.3 HCV 假病毒的定量 .....	15
§2.2 引物和探针的设计与筛选 .....	16
§ 2.2.1 引物的设计与筛选 .....	16
§ 2.2.2 分型探针的设计与筛选 .....	17
§ 2.2.3 沉默探针的设计与筛选 .....	18
§2.3 RT-PCR 分型体系的建立 .....	20
§ 2.3.1 PCR 分型体系 .....	20
§ 2.3.2 RT-PCR 分型体系 .....	20
§2.4 体系检测能力考察及标本检测 .....	21
第三章 结果与讨论 .....	22

§3.1 6 个 HCV 亚型阳性质控品的制备 .....	22
§ 3.1.1 HCV 假病毒的验证 .....	22
§ 3.1.2 HCV 假病毒的定量 .....	24
§3.2 引物探针筛选与检测体系优化 .....	25
§ 3.2.1 分型探针筛选 .....	25
§ 3.2.2 沉默探针筛选 .....	27
§ 3.2.3 引物的筛选 .....	28
§ 3.2.4 RT-PCR 体系优化 .....	30
§3.3 体系分型能力 .....	35
§ 3.3.1 体系的检测灵敏度考察 .....	35
§ 3.3.2 双重感染检测 .....	36
§ 3.3.3 模拟标本检测 .....	37
§ 3.3.4 实际标本检测 .....	38
§ 3.3.5 探针检测 6 个 HCV 亚型的 $T_m$ 参考值 .....	40
§ 3.3.6 HCV 核酸数据库中各基因亚型序列比对结果的统计分析 .....	40
§3.4 总结与讨论 .....	41
参考文献 .....	42

# CONTENTS

<b>Abstract(In Chinese).....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract(In English) .....</b>	<b>2</b>
<b>Chapter I Introduction.....</b>	<b>4</b>
§1.1 General information of HCV.....	4
§1.2 Classification of HCV.....	5
§1.3 Evolution and distribution of HCV genotypes.....	8
§1.4 Clinical significance of HCV genotyping.....	8
§1.5 Laboratory diagnosis of HCV .....	9
§1.6 HCV typing methodologies based on nucleic acids detection.....	10
§1.6.1 Selection of detection zone.....	10
§1.6.2 Nucleotide sequencing .....	11
§1.6.3 Reverse hybridization line probe.....	11
§1.6.4 Invader HCV .....	11
§1.6.5 PCR amplification using type-specific PCR primer .....	12
§1.6.6 Restriction fragment length polymorphism .....	12
§1.6.7 Real-time PCR.....	13
§1.7 The idea of this paper.....	13
<b>Chapter II Materials and Methods .....</b>	<b>14</b>
§2.1 Construction of controls and standards (Armored RNA) .....	14
§2.1.1 Construction of Armored RNA.....	14
§2.1.2 Validation of Armored RNA .....	15
§2.1.3 Quantitation of Armored RNA .....	15
§2.2 Design of Primers and probes .....	16
§2.2.1 Primers.....	16
§2.2.2 Probes for typing.....	17
§2.2.3 Silencing probes.....	18
§2.3 Construction of genotyping system.....	20
§2.3.1 PCR system.....	20
§2.3.2 RT-PCR system .....	20
§2.4 Detection ability of the typing system.....	21
<b>Chapter III Result and Discussion.....</b>	<b>22</b>

<b>§3.1 Preparation of 6 Armored HCV RNA .....</b>	<b>22</b>
§3.1.1 Quality detection of Armord RNA .....	22
§3.1.2 Quantitative result of Armord RNA.....	24
<b>§3.2 Selection of Primers and Probes and construction of genotyping system.</b>	<b>25</b>
§3.2.1 Selection of typing probes.....	25
§3.2.2 Selection of silencing probes.....	27
§3.2.3 Selection of primers .....	28
§3.2.4 Optimization of RT-PCR system .....	30
<b>§3.3 Detection ability of Genotyping system .....</b>	<b>35</b>
§3.3.1 Sensitivity test.....	35
§3.3.2 Double infection .....	36
§3.3.3 Detection result of simulated samples .....	37
§3.3.4 Detection result of serum specimens .....	38
§3.3.5 Melting temperature of the six HCV subtype .....	40
§3.3.6 Statistical analysis on sequences of the six HCV subtypes .....	40
<b>§3.4 Discussion .....</b>	<b>41</b>
<b>References .....</b>	<b>42</b>

## 摘 要

病毒基因型是丙型肝炎抗病毒治疗方案选择的重要依据，常见的分型方法有测序分析、反向线性杂交、实时荧光 PCR 等，不同的方法设计各有优势和不足，本文建立了一个荧光 PCR 结合熔解曲线分析的丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）分型体系，用以区分中国大陆较常见的 HCV 1a、1b、2a、3a、3b、6a 亚型。实验方法如下：一、制备 6 个内含 HCV RNA 核心区核酸序列的病毒样颗粒（HCV 假病毒），分别作为 6 个 HCV 亚型的替代物/阳性质控品；二、设计通用引物扩增出 HCV 基因组的核心区，并设计荧光探针与各 HCV 亚型扩增子杂交，使之得到亚型特异的熔点；三、考察和优化体系的分型能力；四、建立从 RNA 提取到 PCR 产物分析的检测流程，进行标本检测。实验结果：一、制备的 6 个 HCV 假病毒分别包裹了 6 个 HCV 亚型基因组核心区序列，且耐受核酸酶降解；二、通用引物可成功扩增出 6 个 HCV 亚型基因组核心区序列，设计的两条荧光探针与各亚型序列杂交，可得到亚型特异的熔点，从而能够准确区分 6 个 HCV 亚型（在探针检测区有突变的病毒株除外）；三、分型体系的检测灵敏度 1a、1b、2a、3b 和 6a 达到 50 拷贝 RNA，3a 达到 500 拷贝 RNA，对于 1b 和 2a 亚型双重感染，当两者 RNA 比例在 1：95 到 95:1 之间时可以检出；四、用本方法检测由假病毒掺入阴性血清制成的模拟样本，1a、1b、2a、3b 和 6a 检测限为 50 拷贝，3a 检测限为 500 拷贝，可检出的样本均获得准确分型。两份 HCV 阳性血清样本（取自泉州 180 医院），其中一份准确分型为 1b 亚型，另一份未扩增到 HCV 核酸序列，可能是标本在储存和运输过程中病毒降解了。实验结果表明，本文建立的方法基本达到设计目标，可简单快速地区分 6 个 HCV 亚型。

**关键词：**丙型肝炎病毒；基因分型；分子诊断；熔解曲线分析



# Abstract

## Objective:

The genotype of hepatitis C virus (HCV) is a predictor of antiviral therapeutic response, which is to be an important basis for the selection of antiviral therapy. HCV genotypes are usually determined by sequencing, real-time PCR or by the INNO-LiPA test etc. We describe an approach for HCV genotype determination by real-time PCR and melting curve analysis to identify HCV 1a, 1b, 2a, 3a, 3b and 6a subtypes, which are relatively common in mainland China.

## Methods:

1. Six virus-like particles (Armored RNA) containing nucleotide sequences of HCV RNA were prepared as positive controls of the six HCV subtypes.
2. Universal primers were designed to amplify nucleotides in core region of HCV genome, and the product was analyzed through melting curves with the fluorescence probes which was designed to distinguish the six subtypes by different melting temperature( $T_m$ ).
3. The genotyping system was optimized and a capacity assessment has been made.
4. The procedure from RNA extraction to PCR product analysis was established. Simulated samples and two serum specimens were tested.

## Results:

1. Six Armored RNA containing nucleotide sequences of the six HCV subtypes were successfully constructed and quantified. Experiments showed that the Armored RNA was well tolerable against nuclease degradation.
2. The sequences of the six HCV subtypes were successfully amplified with universal primers. Two fluorescent probes were selected with capacity to accurately distinguish the six HCV subtypes.
3. The detection limits of the genotyping system ranged from 50 to 500 copies RNA per reaction: 1a, 1b, 2a, 3b and 6a subtypes were 50 copies; 3a subtype was 500 copies. Double infections of 1b and 2a could be detected when the ratio of this two subtypes' RNA was within 1:95 to 95:1.

4. Simulated samples were made by Armored RNA mixed with negative serum, detection limits of 1a, 1b, 2a, 3b and 6a subtypes were 50 copies, and of 3a subtype was 500 copies, samples within detection limit all had correct genotyping result. Two HCV specimens (have been confirmed positive for HCV RNA as the detection of the 180th Military Hospital): one was genotyped as 1b subtype and confirmed by sequencing; another one had a failure PCR result, and we assumed that was because the virus had degraded in storage or transportation.

**Conclusions:**

The experimental results showed that melting analysis used two fluorescence probes can rapidly identify HCV 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, and 6a subtypes.

**Keywords:** Hepatitis C virus; Genotyping; Molecular diagnostics; Melting analysis

# 第一章 HCV 分型诊断概述

## § 1.1 HCV 概述

1968 年 Goldfield 等发现约 10% 的输血后肝炎患者无 HAV、HBV 感染的血清学标志，认为还有其他类型的肝炎病毒存在，1974 年他们首先报告了输血后非甲非乙型肝炎（Non-A, Non-B Hepatitis, NANBH）<sup>[1]</sup>。1989 年，Chiron 公司的 Choo 等人利用分子克隆手段分离并鉴定了这种非甲非乙型肝炎病毒，将其命名为丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus, HCV）<sup>[2]</sup>。由于 HCV 基因组在结构和表型特征上与人黄病毒和瘟病毒相类似，国际病毒命名委员会将 HCV 归入黄病毒科丙型肝炎病毒属。

HCV 病毒体呈球形，直径约 50nm，在核衣壳外包绕含脂质的囊膜，囊膜上有刺突，为线性单股正链 RNA 病毒。RNA 全长近 10kb，由 5'-非编码区（5'-Untranslated region, 5'-UTR）、3'-非编码区（3'-Untranslated region, 3'-UTR）和一个开放阅读框（Open Reading Frame, ORF）组成。5'-UTR 长约 319-341bp, 3'-UTR 长 27-55bp。ORF 从 5'到 3'端顺序分为 C、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4、NS5 几个区域（图 1-1），能编码长约 3014 个氨基酸的多聚蛋白前体，经宿主细胞和病毒自身蛋白酶作用后，裂解成各自独立的病毒蛋白，包括三种结构蛋白（C、E1、E2）和四种非结构蛋白（NS2、NS3、NS4、NS5）。

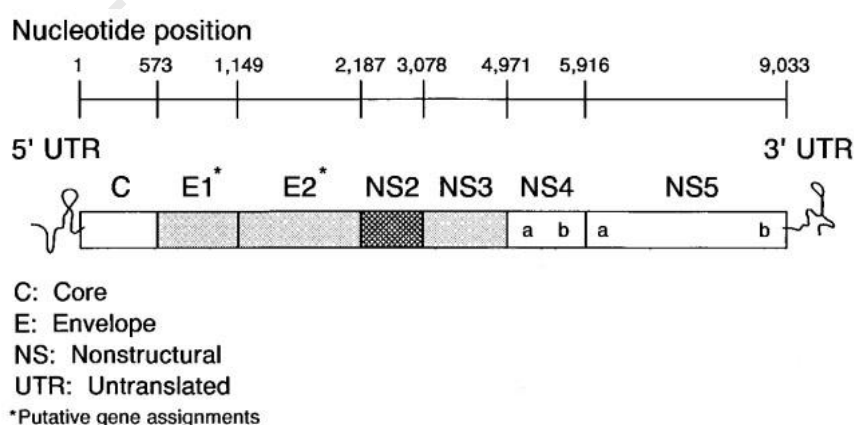


图1-1 HCV的基因组结构<sup>[3]</sup>

Figure 1-1. Genomic organization of HCV<sup>[3]</sup>

HCV 通过血液传播，途径与乙肝病毒类似，仅在人类中流行，实验室

条件下方可感染黑猩猩。HCV 进入人体后，第一周即可从血液或肝组织中检出 RNA，第二周开始，可检出抗 HCV。HCV 的致病机理仍未十分明确，一般推测为：(1)直接损伤，HCV 本身及其表达产物直接对肝细胞产生毒害作用或 HCV 复制干扰了肝细胞内大分子正常的生物合成，从而增加了溶酶体膜的通透性，引起肝细胞病变；(2)免疫损伤，人体在清除 HCV 的同时，不同程度地破坏了自身细胞和组织。

HCV 感染呈全球性，据世界卫生组织估计，全世界 HCV 感染者约 3% (1.7 亿人口)<sup>[4]</sup>。在美国和西欧，每年有 15 万的新感染者，日本有 35 万，世界范围内每年新感染 3~4 百万人群。在这些新感染人群中，50~85% 以上将转为慢性感染（病毒感染持续 6 个月以上）。相比于甲肝和乙肝病毒，HCV 为 RNA 病毒，更容易通过变异逃脱人体免疫系统的攻击，慢性 HCV 感染者自然清除病毒的几率极小，每年约 0.5%~0.74%。大部分慢性感染病人不经治疗自身无法清除病毒而发展成为慢性肝脏疾病，经过 10~20 年的慢性病程后，20% 的病人将发展为肝硬化或肝癌，HCV 感染者发生肝细胞癌的几率是未感染者的 17 倍<sup>[5]</sup>，每年有超过 35 万人死于丙肝相关疾病。如果能及时发现感染，丙肝的治疗效果比乙肝好得多，60%~70% 的慢性丙肝患者可以治愈。然而，在初始感染后，60%~70% 的人群无临床症状，大部分人因而未能及时采取治疗措施，导致了病情的延误。我国一般人群抗-HCV 阳性率为 3.2%，约三千多万感染者。近年来，乙型肝炎的发病率逐年降低，而丙型肝炎的发病率则呈逐年上升趋势，2009 年我国报告的丙肝发病人数是 2001 年的 10 倍，由丙肝造成的疾病负担和死亡人数也在成倍增长。

由于病毒的高度变异性，丙肝疫苗的研制十分困难，目前尚无预防性或治疗性疫苗投入临床应用。2011 年 8 月，法国巴黎第六大学的 David Klatzmann 等发表文章称已研发出一种类病毒颗粒疫苗，这种类病毒颗粒由 HCV 的包膜蛋白包裹，但不具有传染性，注入机体后，会诱导机体产生广谱中和抗体，可中和各种丙肝病毒变异株的感染性，起到预防作用，而针对实验鼠和猴子的实验结果显示，这种疫苗对 5 种丙肝病毒变异株有效<sup>[6]</sup>。

## § 1.2 HCV 基因型分类

由于 RNA 复制酶的低保真性和缺乏校正活性，HCV 基因组极易产生变

异。对已知基因组序列的不同 HCV 株进行比较后发现,其核苷酸和氨基酸序列存在着很大差异。而 HCV 基因组各部位的变异程度也不相一致,整个基因组中,以 5'-UTR 最为保守,C 区(核心区)次之,3'-UTR 最不保守。各区的序列保守程度由高到低依次为:5'UTR、C、NS3、NS4、NS5、NS2、NS1/E2、E1、3'UTR。有些区段变异性极大,被称为高变区(hypervariable region, HVR),如 E2 末端的 HVR1(384-413aa)和 HVR2(474-480aa),其编码的包膜蛋白能诱使机体产生中和抗体,而这段区域发生的抗原性变异,使得病毒能够逃避宿主的免疫监视,形成慢性感染。

根据 HCV 病毒株间的差异程度,可将其区分为基因型、亚型和分离株。历史上曾出现多种 HCV 分型系统,如 Okamoto/Mori、Cha、Enomoto、Tsukiyama-Kohara、Chan/Simmonds 系统等。Simmonds 等人根据对非结构区 NS5 一段长 222 个核苷酸的序列进行测序和种系分析的结果确定了 6 种 HCV 主要基因型及一系列亚型,并以阿拉伯数字表示 HCV 基因型,以小写的英文字母表示基因的亚型(如 1a、2b、2c 等),此分型系统后来发展为国际通用的 HCV 分类命名法(表 1-1)<sup>[7]</sup>。1997 年,国际 HCV 小组根据国际病毒分类委员会(ICTV)的原则,统一了 HCV 的分类与命名,确定丙型肝炎病毒属只包含一个独立的 HCV 原型株 HCV-1,规定当 HCV 基因组的核苷酸序列的变异超过 30%时,为基因型;变异超过 20%时,为基因亚型;变异超过 10%时,为分离株。2005 年达成的 HCV 基因型命名规则共识将已鉴定的 11 个 HCV 基因型统一为 6 个,把原来的 10 型归入 3 型,把 7、8、9、11 型归入 6 型,当时所有已归类的基因型和亚型见表 1-2<sup>[8]</sup>。

HCV 感染机体后,为了逃避免疫压力,随复制的进行会不断地产生变异,形成以一个优势株为主的变异病毒群落,这种情况称为准种,其病毒之间差异小于 10%,并不足以改变原先的基因型和亚型。此外,尽管并不多见,机体有可能同时感染多种 HCV 基因型,因为人体感染 HCV 后产生的保护免疫力差,可再次感染不同或同株 HCV。一般来说,多重感染多发生于缺乏免疫保护,免疫功能低下如 HIV 感染者和频繁暴露于 HCV 感染源,如静脉吸毒者之间共用注射器或血液透析病人的情况。

HCV 基因型、亚型及亚型内部都可能发生重组,但由于目前大部分基

因型鉴定方法都只以 HCV 全基因序列的某个区域作为检测对象，不易发现重组，所以重组的概率很难进行估算。已发现的重组如俄罗斯圣彼得堡静脉吸毒者的 1b 和 2k 亚型重组以及发生于秘鲁的 1a 和 1b 亚型重组等<sup>[9-11]</sup>。我国的一项研究对 222 名病人的血液样本进行了 C-E1 和 NS5b 区的种系分析，而尽管标本中多重感染比例达四成以上，实验中并没有检测到基因型重组，说明在我国东南地区（标本来源地），自然的 HCV 基因型重组十分罕见<sup>[12]</sup>。

**表1-1 HCV基因分型系统<sup>[3]</sup>**  
**Table 1-1. Classification systems for HCV genotypes<sup>[3]</sup>**

Okamoto	Enomoto.	Simmonds	Cha	Consensus
I	PT	1a	I	1a
II	K1	1b	II	1b
				1c
III	K2a	2a	III	2a
IV	K2b	2b	III	2b
			III	2c
V		3	IV	3a
VI			IV	3b
		4		4a
			V	5a
				6a

**表1-2 HCV基因型和亚型**  
**Table 1-2. HCV genotypes and subtypes**

基因型	亚型
1	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l
2	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q
3	a, b, c, d, e, f, g, h, i
4	a, b, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t
5	a
6	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q

### § 1.3 HCV 基因型的进化与分布

据估计，HCV 与人类一起在 10 万到 15 万年前从非洲迁移出来并共同进化<sup>[13]</sup>。在 HCV 流行时间较长的地区，基因型/亚型内部趋异性更为明显，如西非的 1 型和 2 型，印度次大陆地区的 3 型，中非的 4 型，东南亚的 6 型和南非的 5 型。基因型水平的进化至少经历了 500~2000 年，而亚型的进化则经历了 300 年以上的时间<sup>[14, 15]</sup>。基因组进化的速度以 5'-UTR 区最为保守，C 区是其 4 倍，而 E1、E2 则是 5'-UTR 区的 10 倍<sup>[16]</sup>。

HCV 1、2、3 基因型在全球范围内广泛分布，其中以 1b 亚型感染最为普遍。美国和欧洲以 1a 和 1b 型为主，日本以 1b 型为主。2a 和 2b 在北美、欧洲和日本也相对常见，2c 一般见于意大利北部。3a 流行于美国和欧洲的静脉吸毒者<sup>[3]</sup>。4 型主要分布于中东、埃及和中非，5 型流行于南非，6 型流行于东南亚<sup>[17]</sup>。HCV 基因型和亚型的地区分布主要由传播途径决定，可能与输血、疫苗注射和静脉吸毒等活动有关。如果具备这些传播途径，目前感染人数较少的基因型或分布具地方性的基因型，例如 4 型和 6 型，也有可能产生大规模的爆发感染<sup>[16]</sup>。1b 亚型主要经血制品传播，1a、3a 亚型则主要经静脉注射毒品传播。随着血制品筛查的普及，1b 亚型感染正逐渐减少，静脉注射毒品成为目前 HCV 传播的主要途径。

我国以 1b 亚型为主，约占整个感染人群的 70%，其次是 2a 型，其余亚型所占比例较低。然而在我国邻近东南亚的省份和地区（广西、广东、香港和澳门等地），6a 感染人数超过 2a，居第二位，且比例有不断上升的趋势。在云南地区，3 型为优势流行株，比例超过 60%<sup>[18]</sup>。目前我国流行的 HCV 基因型/亚型主要为 1b、2a、6a、3a 和 3b 亚型，1a、2b 亚型稀少，4 型和 5 型几乎未见报道。

### § 1.4 HCV 基因型的临床相关性

目前对 HCV 基因型是否影响疾病严重程度尚存在着争议。不少研究显示，1b 亚型与肝坏死型炎症、肝纤维化、肝硬化以及肝细胞癌等严重的肝脏疾病关系更为密切，1b 型在肝硬化和肝癌中的比例远高于其他亚型，占 80% 以上，有推测说这可能与 1b 型 HCV 病毒具有较强的复制能力，型特异突变基因编码的蛋白具有较强的细胞毒性等有关。但也有研究者认为，1b

型感染者平均年龄比其他亚型感染者大，1b 型感染者肝脏病变更为严重以及疾病恶化得更快，其主要原因在于感染期较长，而不在于 1b 亚型对肝脏的破坏力更强。

然而，基因型对抗病毒疗效的影响是十分显著的，大量临床试验表明，HCV 1b 及 1a 基因型比 HCV 2 型或 3 型对干扰素治疗的 SVR (the sustained viral response, 持续病毒学应答) 更差，1 型 HCV 患者治疗 48 周才达到非 1 型 HCV 患者治疗 24 周的效果。2、3 型 HCV 感染患者对干扰素治疗的 SVR 率是 1 型 HCV 感染患者的 2~3 倍；治疗 4 型 HCV 感染的 SVR 类似或低于 1 型，治疗 5 型的 SVR 接近于 2 和 3 型；治疗 6 型感染获得的 SVR 介于 1 型与 2、3 型感染之间<sup>[13]</sup>。检测 HCV 基因型对于确定用药剂量及治疗时间，制定个体化抗病毒治疗方案具有指导意义。2004 年，中华医学会感染病学分会和肝病学会颁布《中国丙型肝炎防治指南》，建议在丙肝治疗前检测病毒载量和基因型，并针对不同的定量和分型结果给出了不同的参考治疗方案，将诊断结果分两种情况进行考虑：(一)HCV RNA 基因为 1 型，或(和)HCV RNA 定量 $\geq 2 \times 10^6$  拷贝/ml；(二)HCV RNA 基因为非 1 型，或(和)RNA 定量 $< 2 \times 10^6$  拷贝/ml 者。HCV 基因分型的重点在于区分 1 型与非 1 型。

### § 1.5 丙型肝炎的实验室诊断

丙型肝炎的实验室诊断包括血清生化学检测、抗体检测和 HCV RNA 检测。血清生化学检测在一定程度上可以反应肝细胞损害程度；HCV 抗体检出意味着感染过病毒，但无法指示当下的感染情况；HCV RNA 检测则可确诊病毒感染及确定病毒载量和基因型<sup>[19]</sup>。

抗体检测一般适用于 HCV 感染者的初筛，在抗体检出阳性的情况下应进一步做病毒 RNA 测试进行确证。抗体检测也可以用于病毒分型，其原理利用基因型特异的抗体与 HCV NS4 或 C 区编码的抗原表位进行反应而实现分型。目前商品化试剂主要有两种：Chiron 公司的 RIBA SIA 检测 NS4 区和 C 区编码的抗原，可以区分 1~3 型；Murex 公司的 Murex HCV 检测 NS4 编码的抗原，可区分 1~6 型。抗体检测方法简单，少污染，适用于大规模筛查和由于保存、操作处理不当造成 RNA 降解的样本，但是特异性和灵敏



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库